

METHOD FOR AVERTING INFLUENCE OF HEMOGLOBIN

Publication number: JP60168050

Publication date: 1985-08-31

Inventor: NIIMI YASUMASA; SENDA SHIGEO; MURAMATSU HARUTO; ISA TAKAYUKI; MOGI HIDEAKI

Applicant: WAKO PURE CHEM IND LTD

Classification:

- International: G01N33/49; G01N33/48; G01N33/72; G01N33/49; G01N33/48; G01N33/72; (IPC1-7): G01N33/48

- European: G01N33/72B

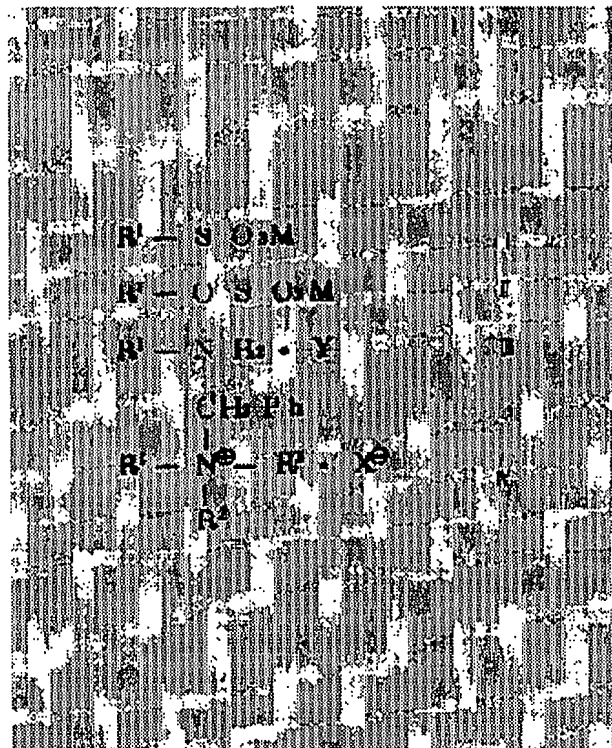
Application number: JP19840024865 19840210

Priority number(s): JP19840024865 19840210

Report a data error here

Abstract of JP60168050

PURPOSE: To prevent easily and surely generation of an error in measuring the components to be inspected in a sample blood by adding 1 or ≥ 2 kinds of surface active agents selected from specific 4 kinds to the sample to conjugate instantaneously said agents with hemoglobin thereby eliminating the absorption thereof. **CONSTITUTION:** 1 or ≥ 2 kinds of surface active agents selected from the group expressed by the formulas I, II, III, IV ($R<1>$ is 11-16C alkyl, $R<2>$ is 1-3C alkyl, M is an alkali metal, Y is a mineral or org. acid, X is halogen or inorg. or org. acid residue) are added to a sample blood. Then the hemoglobin in the blood is immediately conjugated by addition of the surface active agents by which the light absorption of the hemoglobin is changed to the absorption without disturbing the absorption of the intended component. Then absorbancy of the intended component in the blood is measured quickly by using such phenomenon and the exact analysis is made possible.



Data supplied from the esp@canet database - Worldwide

引用文献 4

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-168050

⑬ Int.Cl.*

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月31日

G 01 N 33/48
33/72B-8305-2G
8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑯ 発明の名称 ヘモグロビンの影響回避方法

⑰ 特 願 昭59-24865

⑱ 出 願 昭59(1984)2月10日

⑲ 発 明 者	新 見	康 正	東京都板橋区成増3-1-7-307 成増アーバンライフ
⑲ 発 明 者	千 田	繁 雄	川越市の場1267-3
⑲ 発 明 者	村 松	春 人	川越市新宿町3-15-8
⑲ 発 明 者	伊 佐	隆 幸	東京都豊島区目白5-21-4 五色コーポ201号
⑲ 発 明 者	茂 木	秀 明	三鷹市深大寺4024
⑲ 出 願 人	和光純薬工業株式会社 大阪市東区道修町3丁目10番地		

明 細 書

1. 発明の名称

ヘモグロビンの影響回避方法

2. 特許請求の範囲

(1) ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動が臨床化学分析に与える正負の誤差を回避する目的で、試液中に下記一般式①、②、③、④から成る群より選ばれた一種又は二種以上の界面活性剤を添加することを特徴とする臨床化学分析方法。

① $R^1-S-O-M$ ② $R^1-O-S-O-M$ ③ $R^1-NH_2 \cdot Y$

$$\text{④ } R^1 - \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{Ph} \\ | \\ \text{N}^{\oplus} - R^2 \cdot X^{\ominus} \\ | \\ R^2 \end{array}$$

式中、 R^1 は炭素数11～16のアルキル基、 R^2 は炭素数1～3のアルキル基、 M はアルカリ金属、 Y は酸又は有機酸、 X はハロゲン又は無機酸、有機酸の残基、を兼ねず。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、臨床化学分析に於けるヘモグロビンの影響回避方法に関する。

更に詳しくは、ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動に伴う正負の誤差を回避するために、特定の界面活性剤を用いることを特徴とする、ヘモグロビンの影響回避方法に関する。

近年、臨床化学分析に於ける技術の進歩は著しく、自動分析機の発達と共に、ソフトウェアでの技術開発も盛んに行なわれている。特に、最近はその目的物のみならず、測定対象物に対し正負の誤差を与える血清中の共存物質の除去方法についての研究も盛んである。例えば、ビリルビンの影響を回避する方法としては、過ヨウ素酸消去法、ビリルビンオキシダーゼ酸化法等が開発されており、 L -アスコルビン酸については、ヨウ素酸酸化法、 L -アスコルビン酸オキシダーゼ酸化法等が、またヘモグロビンから鉄の遊離を促す目的には、イミダゾールを始めとする含窒素化合物の添加法等が開発されている。しかしながら、ヘモグロビンの吸光度及びその吸収の経時的変動が、目的物の

特開昭60-168050(2)

測定に対して正負の誤差を与えることに対する回避技術はこれまで無解に近かった。このようなヘモグロビンの影響は、従来の測定方法、即ち、分析する際に本検とは別に検体盲検専用のチャンネルを設け、別個に測定した検体盲検を本検値より差し引くという方法をとっていたところは、それほど問題にはならなかった。ところが、分析機器の発達に伴ない、例えば、試料と、発色成分の1部を含むか、又は発色成分を全く含まない第1試液との混合溶液の吸光度を初めに測定し(第1点の吸光度)、次いで、残りの発色成分、又は全発色成分を含む第2試液を添加して、目的成分を発色させ、再度吸光度を測定し(第2点の吸光度)、第1点の吸光度を最終液量に換算して、第2点測定の吸光度より差し引き、盲検チャンネルを使用せずに検体盲検をより高精度にキャンセルする機構(この機構を以後、2点測定法と略称する。)が開発されるようになると、新たに、ヘモグロビンの影響が大きな問題となってきた。即ち、ヘモグロビンに関しては、液性、試薬組成、反応条件に

より、その吸光度が経時的に減少(まれに増加)し、即ち1点目の吸光度に比べ、2点目の吸光度にはヘモグロビンの吸光度の減少による測定値の低下が顕著に現われ、2点測定法の機能を備えた装置では、その演算機構により記憶された第1点目の吸光度を液量換算して、第2点目の吸光度より差し引くため、2波長測光に於ける主波長、あるいは1波長測光に於ける測定波長が、ヘモグロビンの吸収帯(340~600nm)のより高い吸光度位置にある場合は、通常、目的物の測定に負の影響を、また、2波長測光の副波長がヘモグロビンの吸収帯のより高い吸光度位置にある場合は、正の影響を与えてしまうことがしばしばあった。

従って、この2点測定法では、第1点の吸光度測定から第2点の吸光度測定までのあいだに、測定対象物の吸収以外の妨害物質の吸収が変化しないことが、より高精度な盲検相正の絶対条件であり、かかる目的に適う、すぐれたヘモグロビンの影響回避方法の出現が希求されていた。

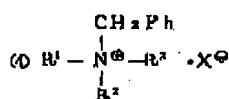
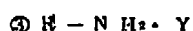
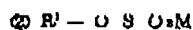
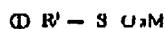
最近、血液中のヘモグロビンを測定するにあつ

た、そのヘモグロビンの吸収を固定することを目的として、脂肪族高級スルホン酸塩を用いる方法が特許出願(特開昭56-120991号)されている。しかしながら、このスルホン酸塩を、ヘモグロビン以外の目的対象物を測定する際のヘモグロビンの影響回避のために、その測定系に用いるということはこれまでに全くなされておらず、このスルホン酸塩が目的物の測定に影響を与えずに、ヘモグロビンの吸収を固定することができるかどうかは全く不明であった。

本発明者らは、ヘモグロビンの影響回避方法について鋭意研究の結果、すでに公知になっている脂肪族高級スルホン酸及びその塩以外にも、C11~C16のアルキル基を持つ硫酸エステル、C11~C16の1級アミン及びその塩類、並びに第4級アンモニウム塩類の1部にも、ヘモグロビンの吸収固定作用があることを見出し、且つ、脂肪族高級スルホン酸及びその塩類を含めたこれら特定の界面活性剤の内1種又は2種以上のものを、ヘモグロビンの妨害をうける目的物の測定の際に、試薬安

定性や溶解性を考慮して、適宜選択して第1試液に添加すれば、目的物の測定に影響を与えず、ほぼ瞬間的にヘモグロビンと結合し、その吸収を固定して経時的変動を抑え、目的物の測定に対し、ヘモグロビンによる正負の誤差をほぼ完全に回避できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、ヘモグロビンの吸収又はその吸収の経時的変動が、臨床化学分析に与える正負の誤差を回避する目的で、試液中に下記一般式①、②、③、④から成る併り選ばれた一種又は二種以上の界面活性剤を添加することを特徴とする臨床化学分析方法である。



式中、R¹は炭素数11~16のアルキル基、R²、R³は炭素数1~3のアルキル基、Mはアルカリ

金属、Yは硫酸又は有機酸、Xはハロゲン又は無機酸、有機酸の残基、を表わす。

上記式中、R¹で表わされる炭素数11~16のアルキル基としては、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基が挙げられ、R²、R³で表わされる炭素数1~3のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基が挙げられ、Mで表わされるアルカリ金属イオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン等が挙げられ、Yとしては、塩酸、硫酸等の硫酸、又は酢酸等の有機酸、Xとしては、塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲン、又はH₂SO₄等の無機酸残基、又はCH₃COO⁻等の有機酸残基が夫々挙げられる。

本発明の方法によれば、オキシヘモグロビンの吸収は瞬時に破壊されてシアノメトヘモグロビンに類似の吸収に変わる為、ヘモグロビンの妨害を受ける恐れのある測定対象物の測定に於て、ヘモグロビンの吸収及びその吸収の経時的変動によって生ずる測定誤差を回避でき、しかも目的物の測

特開昭60-168050(3)

定には何ら影響を与えず、より正確な測定値が得られる。

第1図に、ヘモグロビンの吸収曲線(a)、及びヘモグロビンに本発明に係る界面活性剤を添加した場合の吸収曲線(b)、並びにシアノメトヘモグロビンの吸収曲線(c)を示す。即ち、第1図に於て、(a)はヘモグロビン溶液(15g/dl)2.0mlにpH=8.3の0.01M酢酸ソーダ溶液5.0mlを添加した場合、(b)は同ヘモグロビン溶液に0.5gのラウリル硫酸ソーダを含むpH=8.3の0.01M酢酸ソーダ溶液5.0mlを添加した場合、(c)は同じく、ドラブキン試液(KCN 0.005g、フェリシアン化カリウム0.02g、炭酸ナトリウム0.1g)5.0mlを添加した場合、に於ける夫々の吸収曲線を示している。第1図から明らかな如く、ヘモグロビンに本発明に係る特定の界面活性剤であるラウリル硫酸ソーダ(SDB)を添加すると、同時にオキシヘモグロビンの吸収(a)が破壊され、シアノメトヘモグロビン(c)に類似の吸収(b)に変わる。

本発明に係る界面活性剤とヘモグロビンの結合

体の吸収は、界面活性剤の種類により多少異なるが、いずれも第1図の吸収曲線とはほぼ同様な結果が得られる。尚、ラウリル硫酸ソーダのこれらの作用については既に公知であり、血液中のヘモグロビンの測定に利用されているが、本発明のように、この作用をヘモグロビン以外の物質の測定時に、ヘモグロビンの妨害を防ぐ目的で利用したものは、これまでに全くなく、本発明者らが初めてである。

図1に、本発明に係る各種界面活性剤とこれらを添加した場合のヘモグロビンの吸収変動の関係を示す。

表中、例えば0.160は、ヘモグロビンの吸収が当初のものより0.160低下することを示しており、本発明に係る特定の界面活性剤を添加した場合には、始めは大きく低下し、そのあとの低下は少ないが、無添加の場合には、4~6分後に於ても相当量の低下が見られる。即ち、本発明に係る特定の界面活性剤を添加した場合には極めて短時間の内にヘモグロビンが固定化されて、以後は殆

んど変化しなくなるが、無添加の場合にはいつまでも変化し続けていることが判る。

以下余白



表1 本発明に係る各種界面活性剤とヘモグロビンの吸収変動

界面活性剤	ヘモグロビンの吸収変化 (543nm)				4分後の吸収パターン
	0分	2分	4分	6分	
なし	0.119↑	0.019↓	0.008↓	0.008↓	オキシンヘモグロビン類似パターン
ラウリル硫酸ソーダ $C_{12}H_{25}OSO_3Na$	0.160↑	0.001↓	0.001↓	0.001↓	SDS-ヘモグロビン
セチル硫酸ソーダ $C_{16}H_{33}OSO_3Na$	0.152↑	0.002↓	0.001↓	0.001↓	SDS-ヘモグロビンと類似パターン
ラウリルアミン硫酸塩 $C_{12}H_{25}NH_2 \cdot CH_3COOH$	0.162↑	0.003↓	0.001↓	0.001↓	、
セチルアミン硫酸塩 $C_{16}H_{33}NH_2 \cdot HCl$	0.155↑	0.003↓	0.001↓	0.001↓	、
塩化ベンザルモニウム $C_{12}H_{25}-N^+(CH_3)_3 \cdot Cl^-$	0.148↑	0.006↓	0.002↓	0.002↓	、
塩化セチルモニウム $C_{16}H_{33}-N^+(CH_3)_3 \cdot Cl^-$	0.144↑	0.006↓	0.002↓	0.002↓	、
ラウリルスルホン酸ソーダ $C_{12}H_{25}SO_3Na$	0.172↑	0.002↓	0.001↓	0.001↓	、
セチルスルホン酸ソーダ $C_{16}H_{33}SO_3Na$	0.158↑	0.004↓	0.001↓	0.001↓	、
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_{11}SO_3Na$	0.147↑	0.006↓	0.003↓	0.003↓	、

特開昭60-168050(4)

〔試料〕

Br1j-35〔ポリオキエチレンラウリルエーテル：花王アトラス商品名〕を0.2g含み、本発明に係る界面活性剤を0.5g含むpH=8.3の0.01M硫酸ソーダ溶液を移動する。

〔測定操作〕

ヘモグロビン溶液(1000mg/dl)100μlに、試液20μlを添加し、543nmの波長で吸光度を測定する。

一般に、殆どどのアニオン系又はカチオン系界面活性剤は、オキシンヘモグロビンの吸収をシアニドヘモグロビン類似の吸収に移動させる能力をもつが、しかしながら、実際この作用を臨床検査に利用するとなると、試料と第1試液を混合してから第1点測定(1点)までは2～5分、第1点測定から第2点測定(2点)まで2～5分程度要するのが通常の装置の反応条件であることから、シアニドヘモグロビン類似の吸収には、少なくとも2分以内にほぼ完全に移動することが必要となり、この条件を満足する界面活性剤は本発明のものに限られ、又その添加量は0.01～5.0gの範囲が好ましい。

また、本発明の特定の界面活性剤を添加すると、ヘモグロビンの吸収が540～590nmにかけて約1/2に低下するため、2点測定法のみならず1点測定法でも、ヘモグロビンの影響を約半減することができるので好ましい。

本発明は、ヘモグロビンの吸収又はその吸収の臨時的変動により測定誤差を生ずる恐れのある臨

床化学分析に於て、試液中に特定の界面活性剤を添加することにより、目的とする測定対象物の測定には何ら影響を与えずに、ヘモグロビンの影響を回避でき、従って、それによる測定誤差も回避できるという点に特徴を有する発明であり、ヘモグロビンによる妨害を受ける恐れのある臨床化学分析に於て、より正確な測定値が得られる測定方法を提供するものであって、斯様に貢献するところ甚だ大なるものである。

以下に本発明に係る実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1. 総ビリルビンの測定(ラウリル硫酸ナトリウム使用)

〔試料〕

プール血清1μl、及びプール血清各0.9μlに各種濃度のヘモグロビンを0.1μlずつ添加し、ヘモグロビン濃度をそれぞれ0、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、700、1000mg/dlとしたものを使用。

〔試薬〕

①第1試液

カフェイン	2.5 g
安息香酸ソーダ	3.8 g
酢酸ソーダ	6.3 g
昇リタ A-4Na	0.1 g
Brilj - 36 (花王アトラス調商品名)	0.2 g
ラウリル硫酸ソーダ	0.5 g

②第2試液

スルファニル酸	0.1 g
塩酸	0.1 N

これらを、使用時に0.2 gの重碳酸ソーダ溶液と10:1に混合する。

〔測定方法〕

日立製作所自動分析機736型を使用。

試料10 μl に第1試液400 μlを加え、37℃に3.2分(192秒)放置して、 $\lambda_2 = 546 \text{ nm}$ 、 $\lambda_1 = 600 \text{ nm}$ の2波長で吸光度を測定した後、第2試液100 μlを添加して、37℃で4分間反応し、 $\lambda_2 = 546 \text{ nm}$ 、 $\lambda_1 = 600 \text{ nm}$ の2波長で吸

特開昭60-168050(5)

光度を測定する。第1点の吸光度差(B_1)を $\frac{410}{510}$ 倍して第2点吸光度差(B_2)から差し引き、同様の操作で得た標準の吸光度より、試料中のビリルビン濃度を算出する。

比較例1.

〔試料〕

実施例1.と同じ。

〔試薬〕

①第1試液

実施例1.の第1試液からラウリル硫酸ソーダを除いたもの。

②第2試液

実施例1.と同じ。

〔測定方法〕

実施例1.と同じ。

実施例1.及び比較例1.の総ビリルビン濃度の測定結果を表2に示す。

表 2

測定方法 試料中の ヘモグロビンの濃度	実施例1. ラウリル硫酸ナトリウム 0.5 g含有	比較例1. ラウリル硫酸ナトリウム を含まない
0 mg/dl	0.5 mg/dl	0.5 mg/dl
50	0.5	0.3
100	0.4	0.0
150	0.4	-0.3
200	0.4	-0.6
250	0.4	-1.0
300	0.4	-1.2
350	0.3	-1.5
400	0.4	-1.7
450	0.4	-2.0
500	0.3	-2.4
700	0.3	-3.4
1000	0.3	-4.9

表2より明らかな如く、本発明の方法、即ちラウリル硫酸ナトリウムを添加した場合には、ヘモグロビンがかなりの量混入していても、測定値に

さほどの影響は認められないが、ラウリル硫酸ナトリウムを添加しない場合には、ヘモグロビンによる色の混入が極めて大きく、ヘモグロビンの量によっては、測定値がマイナスの値をとる。

また、実施例1.及び比較例1.に於て、ヘモグロビン濃度(mg/dl) 0(1)及び(1f)、500.(2)及び(2f)、1000(3)及び(3f)の場合の各々の反応タイムコースを、夫々第2図及び第3図に示す。

即ち、第3図では、添加したヘモグロビンが徐々に褪色し、第1測定点で得た検体盲検値から検算算出した理論盲検値を、第2測定点の吸光度 B_2 より差し引くと負の値となり、大幅な負誤差となるのに対し、第2図に示す如く、ラウリル硫酸ナトリウムを0.5 g添加した試薬を使用した場合には、第1試液を混合後、1分以内に吸光度は安定し、第1測定点と第2測定点のあいだのヘモグロビンの吸光度変化が殆んどなくなり、正確な測定結果が得られることがわかる。

このように、ビリルビンの測定に於て、本発明

に係る特定の界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウムを添加することにより、容易に且つ効果的にヘモグロビンの影響を回避できる。

実施例 2 総ビリルビンの測定（塩化ベンザルコニウム使用）

〔試薬〕

①第 1 試液

カフェイン	2.5%
安息香酸ソーダ	3.8%
酢酸ソーダ	6.3%
B D T A - 4 Na	0.1%
Bril - 35	0.2%
塩化ベンザルコニウム	0.2%

②第 2 試液

スルファニル酸	0.1%
塩酸	0.1N

これらを、使用時に 0.2% の亜硝酸ソーダ溶液と 10:1 に混合する。

〔測定方法〕

日本電子クリナライザー VX-1000 を使用。

実施例 3. に同じ。

〔試薬〕

第 1 試液として、実施例 3. の第 1 試液から塩化ベンザルコニウムを除いたものを用いる。第 2 試液は実施例 3. に同じ。

〔測定方法〕

実施例 3. に同じ。

実施例 3. 及び比較例 2. の総ビリルビン濃度の測定結果を表 3 に示す。

表 3

測定方法 試料中 ヘモグロビンの濃度	実施例 3. 塩化ベンザルコニウム 0.2% 含有	比較例 2. 塩化ベンザルコニウム を含まない
0 mg/dl	0.95 mg/dl	0.84 mg/dl
50	1.02	0.77
100	1.02	0.71
150	1.04	0.61
200	1.04	0.47
250	1.16	0.36
300	1.22	0.26
350	1.18	0.04
400	1.23	-0.13
450	1.23	-0.27
500	1.19	-0.42

特開昭 60-168050 (B)

試料 15 μ l に第 1 試液 400 μ l を加え、これを水 165 μ l で反応管に満し、37℃ に 2.5 分放置して、第 1 点吸光度 (D_1) を 540 nm で測定した後、第 2 試液 100 μ l を水 100 μ l で押し出し、37℃ で 2.3 分放置した後、第 2 点吸光度 (D_2) を 540 nm で測定する。第 1 点吸光度 (D_1) を $\frac{540}{780}$ 倍して、第 2 点吸光度 (D_2) より差し引き、同様の操作で得た標準の吸光度より、試料中のビリルビン濃度を算出する。

本実施例に於ける検量線を第 4 図に示す。

実施例 3. 総ビリルビンの測定（塩化ベンザルコニウム使用）

〔試薬〕

実施例 2. に同じ。

〔測定方法〕

試料溶液として、人血清中に各種濃度のヘモグロビンを添加したものを各 15 μ l 用いる。以下の測定方法は実施例 2. に同じ。

比較例 2.

〔試料〕

表 3 より明らかな如く、ビリルビンの測定に於て、本発明に係る特定の界面活性剤である塩化ベンザルコニウムを添加することにより、ヘモグロビンの負影響が大幅に改善されていることがわかる。

実施例 4. 総ビリルビンの測定（同時再現性）

試料としてブール血清及び高価ブール血清を使用し、実施例 2. と同じ試薬（塩化ベンザルコニウム使用）を用い、実施例 2. と同じ測定方法（日本電子クリナライザー VX-1000 使用）により繰り返し総ビリルビンの測定を行う。結果を表 4 に示す。

以下空白



表 4

No	ブール血清	高値ブール血清	No	ブール血清	高値ブール血清
1	1.39 mg/dl	5.56 mg/dl	18	1.42 mg/dl	5.72 mg/dl
2	1.40	5.62	19	1.41	5.80
3	1.40	5.61	20	1.42	5.68
4	1.36	5.52	21	1.37	5.74
5	1.34	5.68	22	1.43	5.53
6	1.37	5.40	23	1.41	5.54
7	1.40	5.52	24	1.39	5.40
8	1.38	5.54	25	1.44	5.61
9	1.44	5.55	26	1.42	5.54
10	1.40	5.62	27	1.45	5.56
11	1.44	5.61	28	1.41	5.56
12	1.30	5.61	29	1.38	5.68
13	1.36	5.58	30	1.46	5.68
14	1.44	5.55	平均	1.406	5.582
15	1.41	5.41	標準偏差	0.0300	0.0834
16	1.41	5.58	変動係数	2.14%	1.49%
17	1.43	5.63			

表 5

No	実施例 5. Y	比較例 3. X	No	実施例 5. Y	比較例 3. X
1	0.35 mg/dl	0.37 mg/dl	16	2.19 mg/dl	1.93 mg/dl
2	0.51	0.61	17	3.18	2.89
3	0.56	0.59	18	5.18	5.11
4	0.44	0.31	19	11.27	11.12
5	0.93	0.90	20	4.41	4.32
6	0.41	0.38	21	3.44	3.48
7	0.69	0.68	22	2.15	2.13
8	0.60	0.47	23	8.87	8.75
9	0.28	0.24	24	12.64	12.50
10	0.71	0.71	25	4.47	4.26
11	0.48	0.48	26	8.20	7.90
12	0.38	0.32	27*	1.19	-0.18
13	0.69	0.45	28	1.98	1.83
14	2.89	2.93	29	0.37	0.26
15	2.27	2.19	30	0.47	0.38

* No 27 は静血試料

表 6 及び表 5 図より明らかなをように、静血の

特開明 60-168050 (7)

表 4 より明らかな如く、本測定法は非常にバラツキが少ない。

実施例 5. 総ビリルビンの測定 (相関)

〔試料〕

人血清 30 検体使用

〔試薬〕

実施例 2. に同じ。

〔測定方法〕

実施例 2. に同じ。

比較例 3.

〔試料〕

実施例 5 と同じ検体 (人血清 30 検体)

〔試薬〕

実施例 5 の試薬から塩化ベンザルコニウムを除いたもの

〔測定方法〕

実施例 5 に同じ。

本発明の測定方法である実施例 6. (塩化ベンザルコニウム使用) と、従来法である比較例 3. の相関を表 6 及び表 5 図に示す。

い検体に於て、本法は従来法と良い相関を示している。 $(Y = 1.011X + 0.0548, r = 0.999)$

4. 図面の簡単な説明

図 1 図は、ヘモグロビン溶液 (1.5 g/dl) 中に、(a) pH = 8.3 の 0.01 M 酢酸ソーダ溶液を添加した場合、(b) 0.5 量のラウリル硫酸ソーダを含む pH = 8.3 の 0.01 M 酢酸ソーダ溶液を添加した場合、(c) ドラブキヤン試液 (KCN 0.005 量、フェリシアン化カリウム 0.02 量、炭酸酸ナトリウム 0.1 量) を添加した場合に於ける夫々の吸収曲線を示し、横軸は吸収波長 (nm) を、縦軸は吸光度 (OD) を表わす。

図 2 図は、実施例 1. に於ける反応タイムコースを示したもので、(1)、(2)、(3) は、夫々ヘモグロビン濃度 (mg/dl) の、500、1000 の場合の反応タイムコースであり、縦軸は 546 nm の吸光度と 600 nm の吸光度の吸光度差 (OD) $\times 10^4$ を示し、横軸は時間 (秒) を表わす。また、 B_1 は第 1 試験添加点、 B_2 は第 1 測定点、 B_3 は第 2 試験添加点、 B_4 は第 2 測定点を示し、 $B_1(1)$ 、 $B_2(2)$

特開昭60-168050 (B)

$E_2(3)$ は、夫々(1)、(2)、(3)の E_2 点に於ける理論消光値(E_2 に於ける消光値を液量補正したもの)を示している。

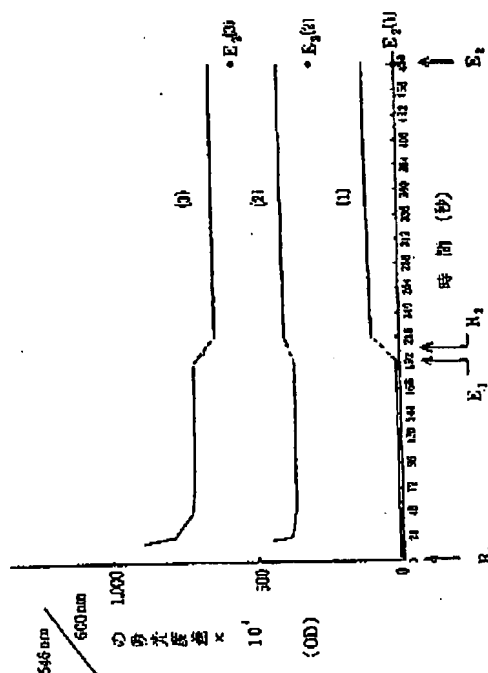
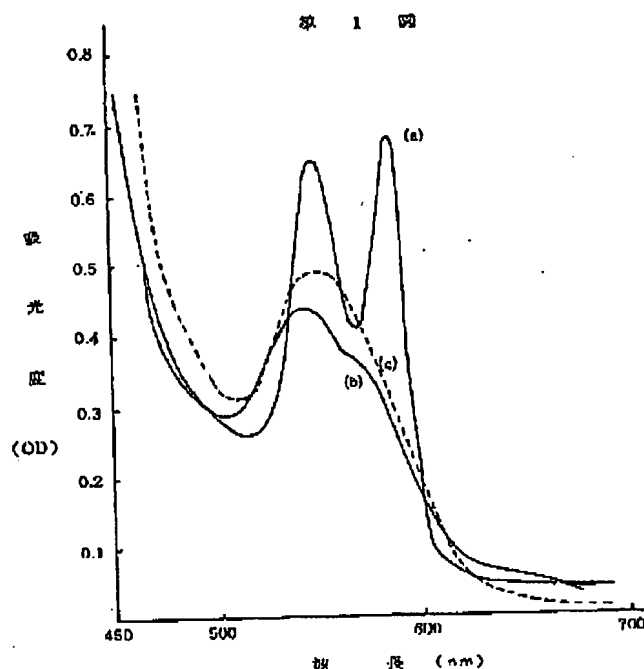
第3図は、比較例1に於ける反応タイムコースを示したもので、(1)、(2)、(3)は、夫々ヘモグロビン濃度($\mu\text{g}/\text{dl}$)0、500、1000の場合の反応タイムコースであり、縦軸は546nmの吸光度と600nmの吸光度の吸光度差(UD) $\times 10^4$ を示し、横軸は時間(秒)を示す。また、 R_1 は第1試薬添加点、 E_1 は第1測定点、 R_2 は第2試薬添加点、 E_2 は第2測定点を示し、 $E_2(1)$ 、 $E_2(2)$ 、 $E_2(3)$ は、夫々(1)、(2)、(3)の E_2 点に於ける理論消光値(E_2 に於ける消光値を液量補正したもの)を示している。

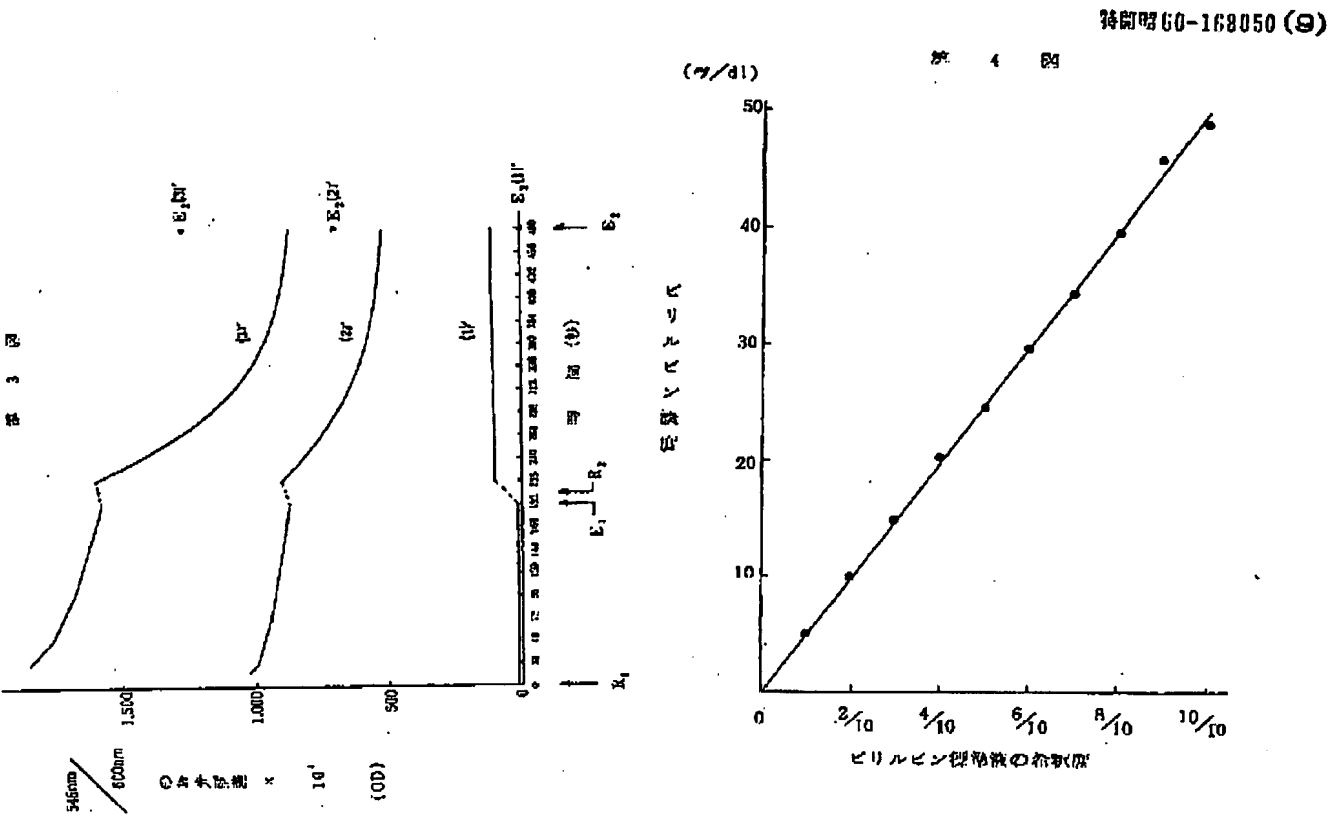
第4図は、実施例2に於ける検量線を示し、横軸はビリルビン標準液の希釈度を、縦軸はビリルビン濃度($\mu\text{g}/\text{dl}$)を示す。

第5図は、本発明の方法である実施例5。(塩化ベンザルコニウム使用)と従来法である比較例3。(塩化ベンザルコニウム使用せず)との相関を示

したもので、縦軸Yは本法に於けるビリルビン測定値($\mu\text{g}/\text{dl}$)を、横軸Xは従来法に於けるビリルビン測定値($\mu\text{g}/\text{dl}$)を表わす。

特許出願人 和光純薬工業株式会社





特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和59年特許願第24865号(特開昭60-168050号、昭和60年8月31日発行、公開特許公報60-1681号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 6(1)

Int. Cl.	識別記号	序内整理番号
G01N 33/48 33/72		B-7055-2G 7055-2G

平成 3. 5. 29 発行

手続補正書

平成 3 年 1 月 3 1 日

特許庁長官 殿



1. 事件の提示

昭和59年特許願第24865号

2. 発明の名称

ヘモグロビンの影響阻害方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号

「平成元年2年13日住所表示変更」

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 田中幹男

4. 代理人

住所 東京都中央区日本橋本町4丁目5番13号

和光純薬工業株式会社 東京支店内

氏名 (8078) 井原士 平井順二

連絡先 特許課(東京)TEL03-3270-9145

5. 補正命令の日付

自 発

3. 5. 1

6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄。

7. 補正の内容

(1) 明細書25頁4行目から5行目にかけて記載の「(15g/d)」中に、「」を「(15g/d) 20ml中に、」と補正する。

(2) 明細書25頁8行目から10行目にかけて記載の「重炭酸ナトリウム 0.1%」を追加した場合」を「重炭酸ナトリウム 0.1%」を夫々5.0ml附加した場合」と補正する。

以上

-(39) -1-